胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 异源表达、纯化及酶学性质分析

郭倩倩[1,2,3] 高登科[1,2,3] 程晓涛[1,2,3] 路福平[1,2,3] 秦慧民[1,2,3]*

（1 天津科技大学生物工程学院 天津 300457 2 省部共建食品营养与安全国家重点实验室 天津 300457 3 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津 300457）

摘 要： 胆固醇氧化酶专一性地催化胆固醇为胆甾-4-烯-3-酮，广泛地应用于临床以及食品加工行业。本论文将来源于 *Pimelobacter simplex* 的胆固醇氧化酶 $PsCO_4$，分别转化到大肠杆菌宿主 BL21(DE3)、Rosetta(DE3)和 C41(DE3)中，在不同温度（15 ℃、25 ℃、37 ℃）及 IPTG 诱导浓度(0.01 mM、0.1 mM、0.5 mM)下异源表达 $PsCO_4$。结果表明，转入 Rosetta(DE3)菌株的 $PsCO_4$ 蛋白，在 IPTG 浓度为 0.1 mM、15 ℃下经 18 h 诱导表达，$PsCO_4$ 可溶性表达量最高(0.63 mg/ml)。异源表达的胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 最适温度为 30 ℃，最适 pH 为 7.5。通过 TLC, GC-MS 检测出 $PsCO_4$ 催化胆固醇生成胆甾-4-烯-3-酮。以胆固醇和β-谷甾醇、豆甾醇和孕烯醇酮为底物，测定 $PsCO_4$ 对四种底物的催化反应动力学参数，胆固醇 k_{cat}/K_m 为 0.08 $s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$ 分别高于β-谷甾醇(0.04 $s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$)、豆甾醇(0.005$s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$)和孕烯醇酮(0.02 $s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$)。

关键词： 胆固醇氧化酶；催化活性；酶学性质；底物特异性

Heterologous expression, purification and enzymatic characterization of cholesterol oxidase $PsCO_4$

GUO Qian-qian[1,2,3], GAO Deng-ke[1,2,3], CHENG Xiao-tao[1,2,3], LU Fu-ping[1,2,3], QIN Hui-min[1,2,3]*

1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology; Tianjin 300457, China

2. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety; Tianjin 300457, China

3. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology Ministry of Education; Tianjin 300457, China

Abstract: Cholesterol oxidase, which catalyzes the reaction of cholesterol to cholest-4-en-3-one, is widely used in clinical and food processing industry. Cholesterol oxidase from *Pimelobacter simplex* ($PsCO_4$) was transformed into *E. coli* BL21(DE3), Rosetta(DE3), and C41(DE3). The bacteria was induced at different temperatures (15 ℃, 25 ℃, 37 ℃), and different IPTG concentrations (0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM). The results showed that $PsCO_4$ was expressed greatly in supernatant of Rosetta(DE3) (0.63 mg/ml), at the conditions of 0.1 mM IPTG and 15 ℃. The optimum temperature and pH of heterologous expressed $PsCO_4$ was 30 ℃ and 7.5. The product of cholesterol catalyzed by $PsCO_4$ was identified by TLC and GC-MS. The substrate specificity of $PsCO_4$ towards cholesterol and β-sitosterol and stigmasterol and pregnenolone was determined. The K_m/k_{cat} value of cholesterol (0.08 $s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$) is higher than β-sitosterol (0.04 $s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$), stigmasterol (0.005$s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$) and pregnenolone (0.02 $s^{-1}\cdot\mu M^{-1}$).

Key word: cholesterol oxidase; catalytic activity; enzymatic property; substrate specificity

基金项目：国家自然科学基金（批准号：31771911）资助。

第一作者：郭倩倩（1992 年生），女，主要研究方向：酶工程

*通讯作者，电子信箱：huiminqin@tust.edu.cn

胆固醇作为自然界中含量丰富的甾醇化合物之一，构成了人体的主要脂类物质，并具有重要的生理功能[1]，例如：细胞膜的重要组成成分，对生物膜的透性有一定的调节作用；内分泌腺合成类固醇激素的原料；有助于血管壁的修复和保持完整[2,3]。尽管胆固醇为人体所必需，但在人体内过量时也会造成危害，如造成动脉硬化、冠心病、脑中风等心脑血管疾病[5]。国内外大量的研究资料证实，膳食因素与心血管疾病的发生关系密切，控制和减少膳食中胆固醇的摄入量，对降低胆固醇水平，预防心血管疾病至关重要[6]。

胆固醇能够被胆固醇氧化酶消化，生成胆甾-4-烯-3-酮和 H_2O_2，也可以作用于含有羟基的甾体类化合物[4]。临床上，广泛应用胆固醇氧化酶来检测血清中胆固醇的浓度。同时，在食品加工行业中应用胆固醇氧化酶来减少食品中的胆固醇。此外，在农业应用方面胆固醇氧化酶作为一种防治鳞翅目害虫的生物农药[7]。动植物来源的胆固醇氧化酶研究较少，目前主要研究集中在微生物来源的胆固醇氧化酶，已报道的产胆固醇氧化酶微生物有：*Arthrobacter*（节杆菌），*Pimelobacter*（脂肪杆菌），*Corynebacterium*（棒状杆菌），*Nocardia erythropolis*（红平诺卡氏菌），*Rhodococcus erythropolis*（红平红球菌），*Mycobacterium*（分支杆菌），*Pseudomonas*（假单胞菌），*Brevibacterium sterolicum*（甾短杆菌），*Rhodococcus* sp.（红球菌）和 *Streptomyces* sp.（链霉菌）。

胆固醇氧化酶对胆固醇的催化反应为三步反应如图 1 所示，第一步反应称作“还原半反应”，将第一个己烷环上的 3-羟基脱氢，随之将两个氧化还原当量转移到氧化态的黄素辅因子（E-FloX）而成为还原态（E-FredH）；第二步反应称作“氧化半反应”，即此时还原态的黄素辅因子与分子氧反应，生成氧化态的黄素辅因子和过氧化氢；最后一步反应叫做“异构化”，即第二个己烷环上的双键从Δ5-6 转移到第一个己烷环上的Δ4-5，最终生成产物胆甾-4-烯-3-酮[8]。

图 1 胆固醇氧化酶的三步催化反应

Fig. 1 Three-step catalytic reaction of cholesterol oxidase

当前，国内外对胆固醇氧化酶的研究已有一定的深度。Sohngen 于 1913 年首次揭示分支杆菌（*Mycobacteria* sp.）能基中生长。Turfitt 发现 *N. erythropolis* 能够降解胆固醇，并首次分离得到胆固醇氧化酶[9]。随后，很多不同来源的胆固醇氧化酶被发现，同时有很多方法也被应用于胆固醇氧化酶的研究当中，如采用蛋白变性再复性的方法对异源表达的不可溶蛋白进行纯化，进而对蛋白进行酶

学性质的研究[12]，此方法已在 $PsCO_3$ 的研究中得到了证实[10]。如今，胆固醇氧化酶的催化机理已被阐明，不同来源的胆固醇氧化酶的空间结构已被解析，但少有对 *Pimelobacter* 来源的胆固醇氧化酶的研究。本文主要介绍了 *Pimelobacter simplex* 来源的胆固醇氧化酶基因 $PsCO_4$ 异源表达、经分离纯化后重组酶的酶学性质，以及通过结构模拟揭示其催化反应机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及仪器

大肠杆菌 BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、C41(DE3)，pET-28a(+)质粒以及 *Pimelobacter simplex* 为本实验室保藏；实验使用常规试剂为国药集团化学试剂有限公司（上海，中国）和上海生工生物工程股份有限公司（上海，中国）生产。胆固醇及胆甾-4-烯-3-酮标准品，抗生素购置 Sigma。酵母提取物及胰蛋白胨为 OXOID 公司生产。Ni-NTA Surperflow 及 Open Column 为德国 QIAGEN 公司生产，10 KDa 超滤管购自 Millipore 公司。低分子量蛋白质 Marker，质粒小提试剂盒购自 OMEGA，BCA 蛋白浓度试剂盒购自北京 Solarbio 科技有限公司（北京，中国）。限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I，连接酶 solution I，DNA 聚合酶 Prime STAR Max 均购自宝日医生物技术有限公司(北京，中国)。离子交换色谱柱（SOURCE™ 15S）和凝胶过滤色谱柱(Superdex™ 200 Increase)均购自美国 GE 公司。

1.1.2 仪器

SDS-PAGE 电泳系统、Quantity One 凝胶成像系统；TU 1810 紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器公司（北京，中国）；Avanti J-26s xp 低温高速离心机购自美国 Beckman Coulter；Multifuge X1R 台式冷冻离心机、酶标仪购自德国 Thermo scientific；Mastercycler nexus PCR 仪购自德国 eppendorf AG；ÄKTA™ pure 购自美国 GE 公司；超声波细胞粉碎机购自宁波新艺超声设备有限公司（浙江，中国）。

1.2 方法

1.2.1 $PsCO_4$ 异源表达载体的构建

以 *P. simplex* 基因组为模板，设计引物 Primer F：(CGGAATTC ATGCACGCAG AAGACCGCG)， Primer R：(CCGCTCGAG TCAGCCGCGGT TGGGCCACAC)，进行 PCR 扩增目的基因片段。PCR 体系为 25 μl，程序为：98 ℃预变性 30 s；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 10 s，30 个循环；72 ℃延伸 7 min。将获得的扩增片段以及载体 pET-28a(+)用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 进行双酶切反应，酶切产物经 Cycle-pure kit (OMEGA)纯化回收，Solution I 过夜低温连接，通过热击转化法转入 *E. coli* JM109 中，挑取转化子菌落 PCR

以及单双酶切进行验证，最后送样品至测序公司进行验证。

1.2.2 重组蛋白表达条件优化

为了获得大量可溶性重组蛋白，对蛋白诱导表达条件进行合理优化。选择大肠杆菌宿主：BL21(DE3)、Rosetta(DE3)、C41(DE3)；IPTG 诱导浓度：0.01 mM，0.1 mM，0.5 mM；诱导温度 15 ℃、25 ℃、37 ℃。离心收集菌体并破碎，高速离心取上清进行 SDS-PAGE 电泳分析。使用 Quantity One 采集凝胶图像，用 Image Lab 软件对 SDS-PAGE 电泳图做灰度分析，研究不同诱导条件下目标蛋白表达量所占百分比。使用 BCA 试剂盒测定上清液总蛋白的浓度，计算不同表达宿主、诱导条件下的 $PsCO_4$ 表达量。

1.2.3 重组蛋白的纯化步骤及条件

将构建好的重组质粒通过热击转化法转入 *E. coli* BL21 中过夜培养，挑取转化子转接试管培养，再转接到摇瓶中诱导表达，5000 rpm 10min 离心收菌。异源表达的蛋白 $PsCO_4$ 在 N 端含有 His 标签。采用亲和层析法（Ni-NTA Surperflow 树脂）初步纯化蛋白，收集菌体后，加入适量裂解缓冲液，超声破碎，40 000 g，4 ℃离心 30 min，取上清液与提前平衡的 Ni-NTA Surperflow 结合 1 h，使用洗杂缓冲液，洗脱 20 个柱体积，洗脱杂质蛋白，用 10 个柱体积洗脱缓冲液溶出目标蛋白 $PsCO_4$; 采用离子交换层析、凝胶色谱层析进一步对蛋白进行纯化，用上一步纯化得到的洗脱缓冲液进行离子交换（4MPa，3ml/min），分子筛（2.3MPa，0.5ml/min）。

1.2.4 $PsCO_4$ 酶学性质测定

酶活力检测方法参考季文明等[11]的方法。溶液 A（4-氨基-安替比林 1 mM，苯酚 6 mM，辣根过氧化物酶 7000 U/L，PBS 缓冲液）；溶液 B（0.08% 胆固醇，4.3% Triton X-100，异丙醇）。酶活定义：30 ℃，PBS 缓冲液 pH 7.5，每分钟催化胆固醇生成 1 μmol H_2O_2 所需要的酶量，定义为一个酶活力单位(U)，酶活测定方法将 3 ml 溶液 A 和 150 μl 溶液 B 混合，30 ℃保温 3 min 后加入 50 μl 适量浓度酶液，准确反应 5 min，置于沸水终止反应。500 nm 测定光吸收值 OD500，根据酶活定义及 H_2O_2 的标准曲线计算酶活。

最适温度的测定，在不同温度（20-60 ℃）下测定胆固醇氧化酶的比酶活，以比酶活最高者为 100%。将胆固醇氧化酶在不同温度下保温 1 h 后，迅速冷却至 0 ℃，测定酶的残余酶活力。

分别用浓度为 20 mM 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0-8.0)、HEPES (pH 7.0-8.0)、Tris (pH 7.0-9.0)、MES (pH 5.5-6.5)、甘氨酸 (pH 8.5-9.0)的缓冲溶液配置测定酶活力的溶液 A，以酶活最高者为 100%。此外，将酶液用不同 pH 值的缓冲液稀释，在 4° C 下放置 1 h 后，测

定其残余酶活力。

酶动力学参数测定方法为：以胆固醇、β-谷甾醇、孕烯醇酮及豆甾醇作为底物，底物溶度范围设定在 10-2000 μM 之间。最后数据通过 GraphPad Prism (version 5.00)软件中的 Michaelis-Menten 方程拟合计算相应的 K_m，V_{max}，k_{cat} 值。

1.2.5　催化产物胆甾-4-烯-3-酮 TLC 及 GC-MS 分析

Ni 亲和层析所得的 $PsCO_4$ 蛋白液通过透析置换于反应缓冲液 Exchange A（50 mM Tris-HCl pH 8.0，200 mM NaCl，3 mM DTT and 25 μM FAD）中。1 ml 酶催化反应体系组成为：50 mM Tris-HCl pH 8.0，50 μg $PsCO_4$，5 μM FAD，3 mM DTT，10 mg 胆固醇（溶于 0.8% 异丙醇，w/v），置于 30 ℃下过夜反应。

反应体系中加入 500 μl 乙酸乙酯萃取（重复三次）后，N_2 吹干溶于 50 μl 甲醇，并进行 TLC 及 GC-MS 分析。TLC 流动相（石油醚：乙酸乙酯= 4:1）。20 min 后于紫外（254 nm）下观察。

气相色谱-质谱法联用：1 μl 的上样量，GC-MS (VARIAN 4000 GC/MS)，以 HP-5 ms (30 m×0.25 mm × 0.25 mm，Agilent Technologies)色谱柱分离胆固醇及催化产物，离子模式为 70 eV。升温程序为：以 150 ℃ 为初始温度并保持 3 min，然后以 5 ℃ /min 速度升到 300 ℃，保持 10 min。结果与 NIST 数据库比对进行分析鉴定。

2　结果与讨论

2.1　重组表达载体 $PsCO_4$-pET28a 验证

用 *Eco*R I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切 $PsCO_4$-pET28a，可以得到 5.3 kbp 和 1.6 kbp 两条带；同时利用菌落 PCR 也得到了 1.6 kbp 的清晰条带，如图 2 所示，与目的基因长度一致，经测序验证正确，重组质粒构建成功。

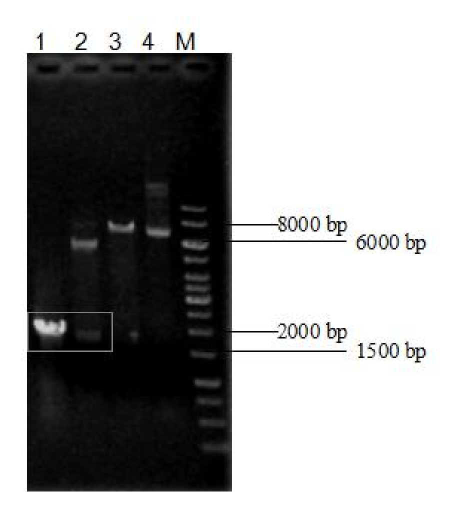


图 2　$PsCO_4$ 酶切及菌落 PCR 验证

1：菌落 PCR；2：双酶切；3：EcoR I 单酶切；4：$PsCO_4$-pET28a；M：DNA Marker

Fig.2 Enzyme digestion and Colony PCR of $PsCO_4$-pET-28a

1：Colony PCR；2：Double enzyme digestion；3：EcoR I digestion； 4：$PsCO_4$-pET28a；5：DNA Marker KB ladder

2.2 $PsCO_4$ 诱导表达的条件优化

利用生物信息学软件 DNAMAN 分析 $PsCO_4$ 核酸序列，预测出 $PsCO_4$ 分子量约为 57. 3 kDa。用 BCA 法测定不同诱导条件下，各自上清可溶性蛋白的浓度，然后再通过 Image lab 灰度分析 SDS-PAGE 电泳图，最后计算出目标蛋白的浓度。最终结果表明，选取大肠杆菌 Rosseta(DE3)作为宿主菌，并在低温 15 ℃ 和 0.1 mM IPTG 浓度下诱导 18 h，破碎上清可溶性目标蛋白量最高为 0.63 mg/ml。一般情况下，高温高浓度 IPTG 诱导得到的目标蛋白浓度很低，可能是由于高温高浓度的诱导条件会使目标蛋白肽链合成速度过快，以至于没有足够的时间进行正确折叠，导致形成很多折叠错误的蛋白质，最后形成包涵体沉淀。所以，低温以及适当浓度的 IPTG 对于形成可溶性有活性的蛋白是必要的。

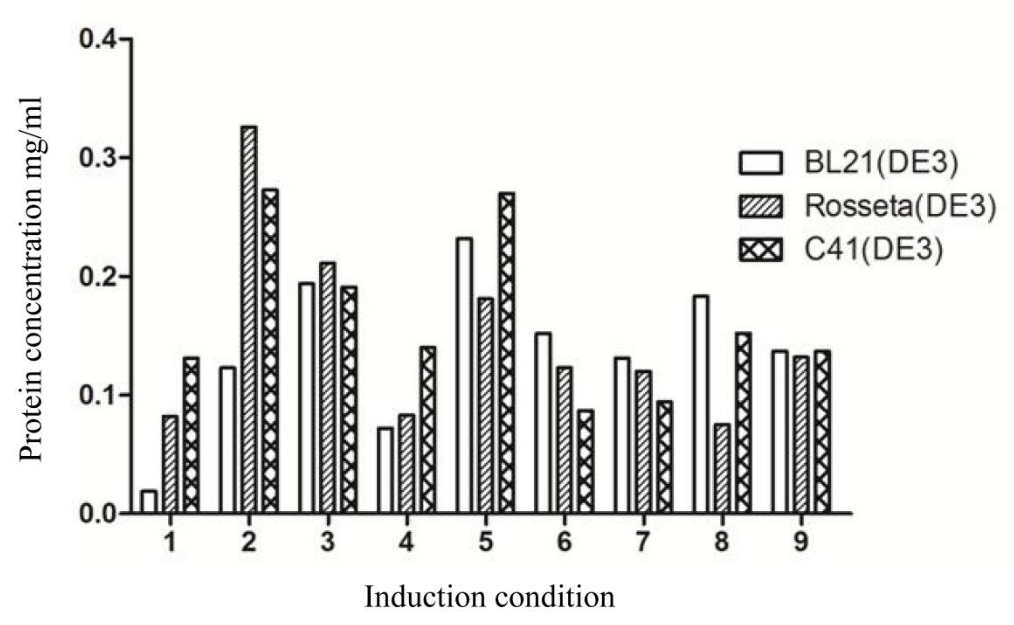


图 3 不同诱导条件下可溶性蛋白的浓度

诱导条件：1-3: 15 ℃ 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L IPTG; 4-6: 25 ℃ 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L IPTG; 7-9: 37 ℃ 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L IPTG.

Fig.3 The concentration of soluble $PsCO_4$ in different induction conditions.

Induction conditions: 1-3: 15 ℃ 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L IPTG; 4-6: 25 ℃ 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L IPTG; 7-9: 37 ℃ 0.05, 0.1, 0.5 mmol/L IPTG.

2.3 $PsCO_4$ 诱导表达及纯化

通过对 SDS-PAGE 电泳图（图 4A）分析发现：目标蛋白可以可溶性表达于上清，但也有大量蛋白错误折叠，以包涵体形式存在于沉淀中。通过 Ni-NTA 亲和层析可以看出，50 mM 咪唑的漂洗缓冲液中含有较多目标蛋白，说明 $PsCO_4$ 和 Ni-NTA 树脂亲和力较弱，即使如此，洗脱液中依然洗脱下大量的目标蛋白。该结果也与前述蛋白表达条件优化中，以

Rosetta(DE3)作为宿主菌，在低温 15 ℃和 0.1 mM IPTG 浓度下诱导，蛋白的表达量最高相符。从离子交换层析图（图 4B）中可以看出目标蛋白响应值高达 370 mAU，在盐浓度约为 500 mM 时开始被大量洗脱下来，图 5 可以看出目标蛋白在 14ml 流出，介于 13ml（Protein Marker 13.7 kDa）和 17ml 之间（Protein Marker 75.0 kDa），可以断定 $PsCO_4$ 是以单体形式存在。SDS-PAGE 分析可得到高达 95% 以上纯度的目的蛋白，进而可以进行准确的蛋白浓度测定和酶动力学参数测定。

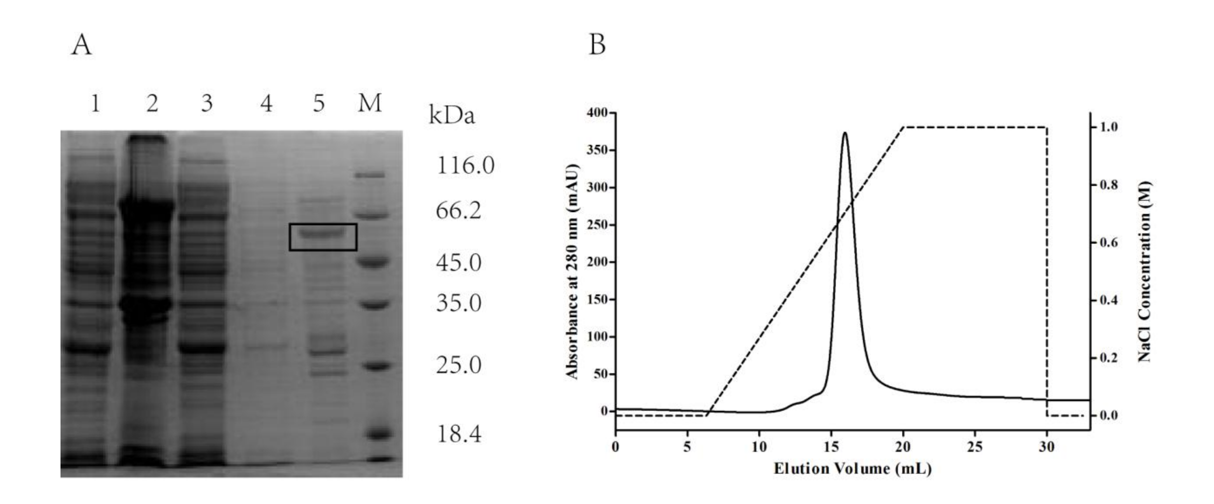


图 4 亲和层析和离子交换层析

（A）1：上清；2：沉淀；3：流穿液；4：洗杂液； 5：洗脱液；

（B）离子交换层析图

Fig.4 SDS-PAGE of affinity chromatography and Ion exchange chromatography

（A）1:supernatant; 2:precipitant; 3:flowthrough; 4: washing buffer; 5:elution buffer;

（B）Ion exchange chromatography

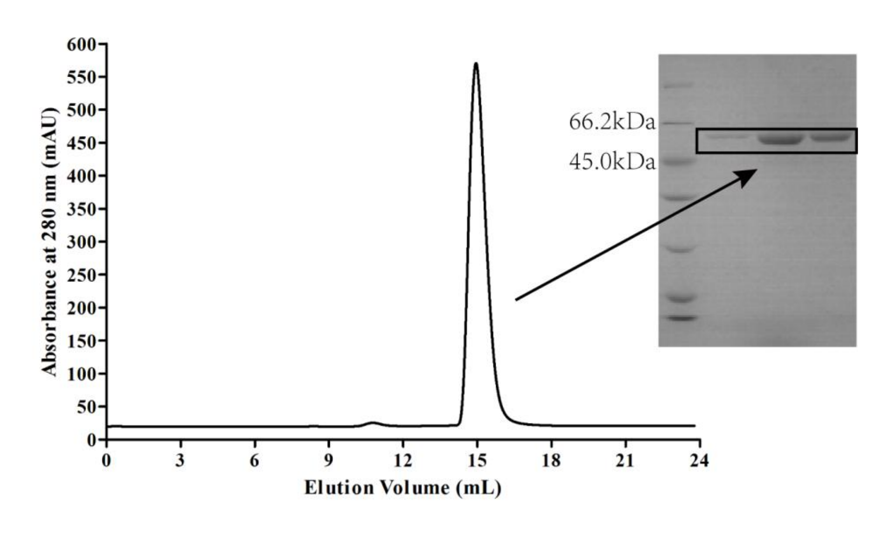


图 5 凝胶过滤层析

Fig.5 Gel filtration chromatography

2.5 酶催化产物鉴定

胆固醇氧化酶特异性催化底物胆固醇成胆甾-4-烯-3-酮，并且该产物在紫外（254 nm）下可以显色。通过 TLC 薄层色谱法分析，初步验证了 $PsCO_4$ 具有催化胆固醇的活性（图 6A）。

利用气相色谱-质谱法联用检测酶催化产物，如图 6B，发现胆固醇及胆甾-4-烯-3-酮分别在保留时间 34.29 min、35.17 min 处有吸收峰，质谱检测结果与 NIST 库比对高度一致，124 m/z 为其特征离子峰，进一步证明异源表达的 $PsCO_4$ 在体外依然具有催化胆固醇生成胆甾-4-烯-3-酮的氧化活性。

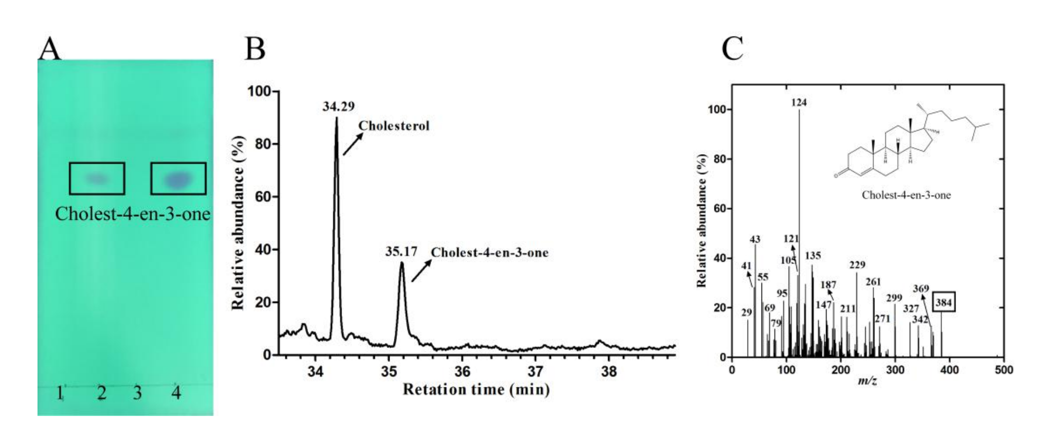


图 6 薄层色谱法和气相色谱-质谱联用法鉴定催化产物

（A）TLC 1：空质粒 pET-28a；2：$PsCO_4$-pET28a；3：胆固醇标品；4：胆甾-4-烯-3-酮标品；

(B) and (C) GC-MS

Fig.6 Product analysis with （A）TLC and（B, C）GC-MS

（A）1:Vector pET-28a; 2: $PsCO_4$-pET28a; 3:Cholesterol; 4: Standard of 4-Cholesten-3-one;

2.6 酶学性质分析

通过 1.2.4 的方法将 $PsCO_4$ 置于不同温度、pH 条件下进行催化反应，测出 $PsCO_4$ 最适的反应条件。

在 25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃和 60 ℃下，测定 $PsCO_4$ 最适反应温度。图 7A 表明，当温度低于 30 ℃时，胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 活性随着温度的上升而缓慢上升，而当温度高于 30 ℃时，其活性逐渐下降。将胆固醇氧化酶置于不同 pH 的环境下处理后反应，结果如图 7B 所示，随着 pH 值得上升，$PsCO_4$ 表现出升高的催化活性，当 pH = 7.5 时，酶活力达到最大值，而当 pH > 7.5 时，酶活力呈现下降趋势，说明胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 在弱碱环境下保持较高活性，最适反应 pH 为 7.5。

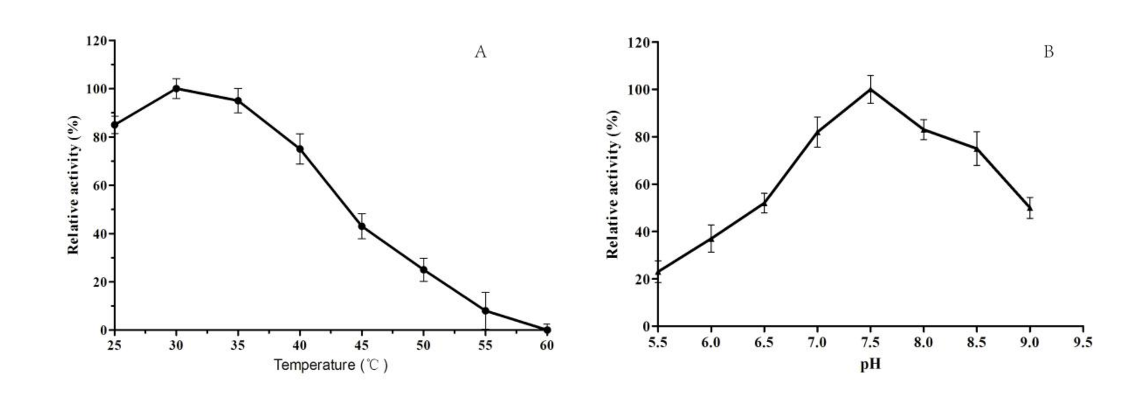


图 7　温度（A）和 pH（B）对胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 酶活的影响

Fig.7　Effect of temperature (A) and pH (B) on the $PsCO_4$

2.5 酶动力参数

$PsCO_4$ 对胆固醇、β-谷甾醇、豆甾醇和孕烯醇酮的动力学参数如下表所示，可以看出胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 对胆固醇有较高的活性，其豆甾醇相对活性约只有 67.20%。通过比较二者动力学参数可以发现，胆固醇的 K_m 为 231.21 μM，低于豆甾醇等底物，说明 $PsCO_4$ 对胆固醇的亲和力较强，这也说明 $PsCO_4$ 对胆固醇的催化活性较高的原因。k_{cat}/K_m 表示的是酶对底物的催化效率，胆固醇的 k_{cat}/K_m 值 2 倍高于β-谷甾醇，并且其反应速率 k_{cat} 也明显高于β-谷甾醇，说明来源于 *P. simplex* 的 $PsCO_4$ 对胆固醇有更高的偏好性。通过胆固醇及β-谷甾醇结构比对发现，β-谷甾醇在 C-22 位上多了个-C_3H_7，使其空间结构上更加复杂，在酶反应过程中β-谷甾醇在进入酶活性中心时，比胆固醇受到更多的空间位阻，可能是导致其活性低于胆固醇的主要原因。

表 1 胆固醇氧化酶的酶学性质

底物	比酶活 ($U·mg^{-1}$)	相对酶活 (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}·μM^{-1}$)
胆固醇	11. 02	100	231.21 ± 11.20	18.49 ± 1.81	0.08
β-谷甾醇	7.41	67.20	362.25 ± 23.50	14.49 ± 1.09	0.04
豆甾醇	0.04	0.35	526.23±10.60	2.54±0.47	0.005
孕烯醇酮	1.00	9.10	300.98±2.51	5.99±0.68	0.02

Table.1 Cholesterol oxidase enzymatic properties

2.6　$PsCO_4$ 三维结构及催化机制分析

来源不同的胆固醇氧化酶其氨基酸序列存在较大的差异，所以蛋白质的空间结构也存在较大的差异。检索 PDB 数据库，$PsCO_4$ 与 *Brevibacterium sterolicum* 来源的胆固醇氧化酶在

氨基酸序列比对中具有较高的相似度。用 SWISS-MODEL（http: / /swissmodel． expasy． org)同源建模。$PsCO_4$的功能结构由两个结构域组成，即辅因子 FAD 结合区域和底物结合区，分子模拟如图 8 粉色为 FAD，黄色为底物类似物。从图中可以看出 $PsCO_4$结合底物氨基酸有 W56、M402、K346、L306、I409、I398、L400 与 PsChO 的底物结合氨基酸 V204、P63、V46、F70、L360、T329、E346 完全不同[13]。且底物结合区有足够大的空间可以容纳胆固醇。胆固醇结合位点是由隔离了蛋白外界环境的大量 loop 包围形成的疏水“口袋”组成，这个区域表现出更高的柔性，通过模拟对比发现 $PsCO_4$ 与 *P. simplex* 来源的 PsChO[13]和 *Brevibacterium sterolicum* 来源的胆固醇氧化酶 1coy 相比具有较大的底物入口通道直径为 11.8Å如图 9 所示。更有利于底物出入活性中心进行催化反应。据参考文献[14]报道在底物胆固醇进入疏水口袋时，相关 loop 在空间结构上会进行调整，从而促进生物催化反应的顺利进行。

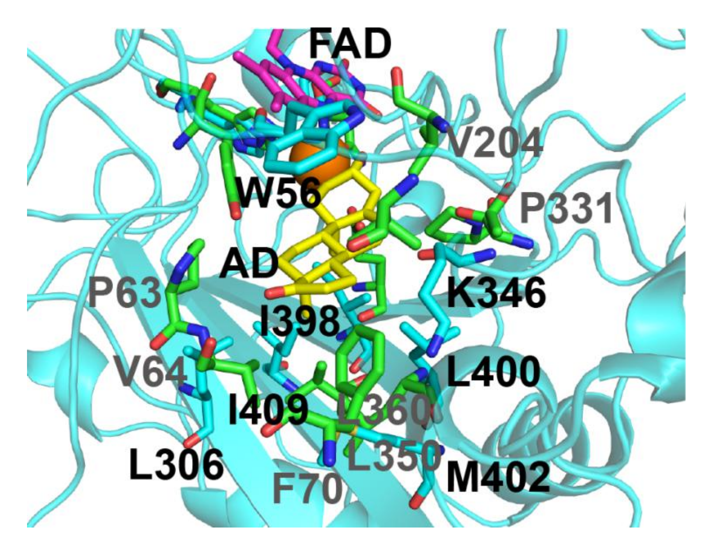


图 8 $PsCO_4$活性中心底物结合关键氨基酸比较图

Fig. 8 $PsCO_4$ active center substrate binding key amino acid comparison

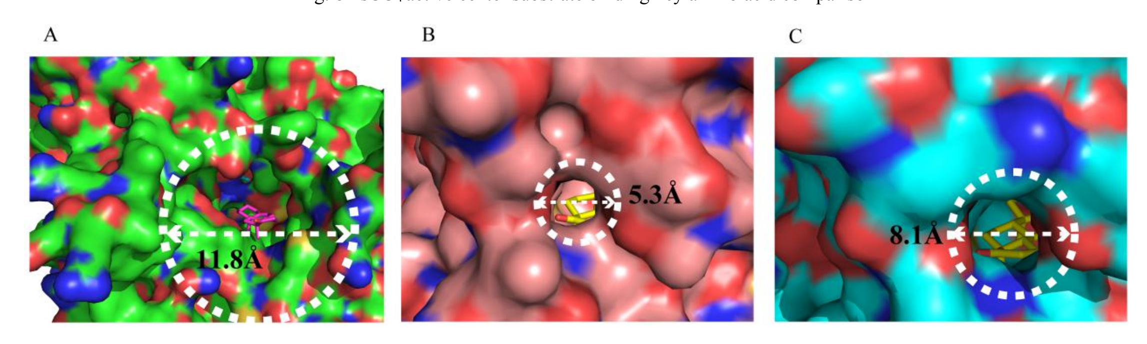


图 9 不同来源胆固醇氧化酶底物结合通道

（A）$PsCO_4$的模拟底物结合通道

（B）PsChO 的底物结合通道

（C）*Brevibacterium sterolicum* 来源的胆固醇氧化酶 1coy 底物结合通道

Figure 9 Cholesterol oxidase substrate binding domains from different sources

（A）$PsCO_4$ mimic substrate binding channel

（B）PsChO substrate binding channel

（C）Cholesterol oxidase 1coy substrate-bound channel from Brevibacterium sterolicum

胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 具有两种催化功能，首先胆固醇氧化酶的氧化脱氢，即：作用于胆固醇 C3 上的β-羟基氧化其为胆甾-5-烯-3-酮；接着是异构化：胆甾-5-烯-3-酮在胆固醇氧化酶作用下将 C4 β位上质子转移到 C6 位上，最终生成产物胆甾-4-烯-3-酮。活性中心的 His469 在氧化过程中起到从类固醇底物的 C3-OH 中提取质子的碱催化剂的作用，质子氢从底物 C3 传递到 FAD-N5，并且随后作为用于稳定异构化中的二烯醇中间体的酸[15]，其催化反应基元反应如图 10。

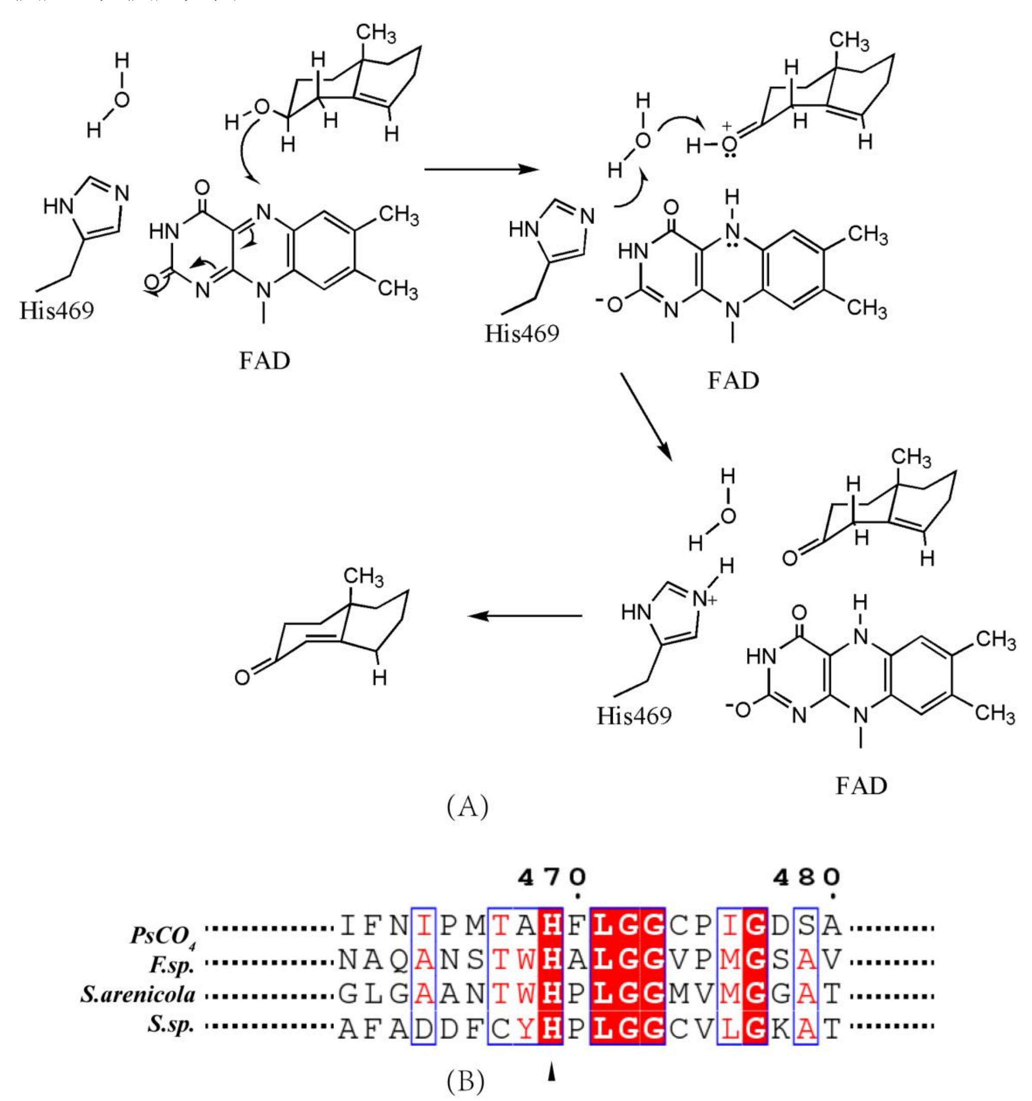


图 10 胆固醇氧化酶催化机制（A）[16]和胆固醇氧化酶序列比对（B）

Figure 10 Cholesterol Oxidase Catalytic Mechanism (A) [15] and Cholesterol Oxidase Sequence Alignment (B)

注:*F. sp.*: *Frankiasp.*EAN1pec, WP_020461426; *S. arenicola: Sarenicola arenicola* CNS-205 WP_012182946; S. sp.: Streptomyces sp., AAA26719.

3 结 论

胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 在大肠杆菌 Rosetta(DE3)实现了高效的表达。蛋白经过 Ni 亲和层析发现，$PsCO_4$ 与 Ni 树脂之间的亲和力较弱，低浓度的咪唑就能洗脱出蛋白。测得纯化出来的酶液的酶学性质，发现酶的最适反应温度为 30 ℃，最适 pH 7.5。胆固醇为底物的催化反应其产物经 TLC、GC-MS 验证为胆甾-4-烯-3-酮。以胆固醇豆甾醇、β-谷甾醇和孕烯醇酮为底物，初步研究该胆固醇氧化酶 $PsCO_4$ 对底物的特异性，发现其对胆固醇的催化活性较高。对 $PsCO_4$ 进行三维建模，底物结合位点的分析。该研究为后续更深入研究 $PsCO_4$ 的底物特异性及催化机理提供理论依据。

参考文献

[1]王镜岩，朱圣庚，徐长法． 生物化学(上、下)第三版[M]． 北京：高等教育出版社，2002．114

Wang J G, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry, third Edition [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002. 114

[2] 张士亮． 胆固醇与人体健康[J]． 生物学通报，1998，33 (11)：22-23

Zhang S L. Cholesterol and human health. Bulletin of Biology [J]. 1998, 33 (11): 22-23

[3] 周东明． 胆固醇缺乏对 Jurkat 细胞增值功能及凋亡的影响[J]． 第三军医大学学报，2000， 22 (4) ：363-365

Zhou D M. The effect of cholesterol deficiency on the proliferation and apoptosis of Jurkat cells [J]. Journal of Third Military Medical University, 2000, 22 (4): 363-365

[4] Doukyu N, Nihei S. Cholesterol oxidases with high catalytic activity from Pseudomonas aeruginosa: Screening, molecular genetic analysis, expression and characterization[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(1): 24-30

[5] 沈同，王镜岩，生物化学(上、下)第一版[M]． 北京：高等教育出版社，1999 年．

Shen T, Wang J Y, Biochemistry, first edition [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.

[6] 欧阳红，杨秀芳． 心脑血管疾病饮食调节[M]． 北京：金盾出版社，2009 年：187

Ouyang H, Yang X F. The diet regulation of cardiovascular and cerebrovascular diseases [M]. Beijing: Jindun publishing house, 2009: 187

[7] Mathieu J M, Wang F, Segatori L, et al. Increased resistance to oxysterol cytotoxicity in fibroblasts transfected with a lysosomally targeted Chromobacterium oxidase[J]. Biotechnology And Bioengineering, 2012, 109 (9): 2409-2415

[8] 王冠超． 重组胆固醇氧化酶的表达与纯化研究[D]．无锡：江南大学，食品学院，2014．

Wang G C. Expression and purification of recombinant cholesterol oxidase[D]. Wuxi: Jiangnan University, School

of food science and technology, 2014.

[9] Turfitt G. The microbiological degradation of steroids: 2. Oxidation of cholesterol by Proactinomyces spp[J]. Biochemical Journal, 1944, 38(5): 492

[10] Qin H M, Wang J W, Guo Q Q, et al. Refolding of a novel cholesterol oxidase from Pimelobacter simplex reveals dehydrogenation activity[J]. Protein Expression & Purification, 2017, 139(7): 1-7

[11] Kojima K, Kobayashi T, Tsugawa W, et al. Mutational analysis of the oxygen-binding site of cholesterol oxidase and its impact on dye-mediated dehydrogenase activity[J]. Journal Of molecular Catalysis B-enzymatic, 2013, 88(88): 41-46

[12] Glynou K, Ioannou PC, Christopoulos TK. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography[J]. Protein Expression & Purification, 2003, 27(2): 384-390

[13] Qin H M, Zhu Z L, Ma Z, et al. Rational design of cholesterol oxidase for efficient bioresolution of cholestane skeleton substrates[J]. Scientific Reports. 2017, 7:16375

[14] 季文明，陈毅力，张和春．比色法测定胆固醇氧化酶酶活．无锡轻工大学学报，2000，5(19)：251-254

Ji W M, Chen Y L, Zhang H C,et al. Assay of cholesterol oxidase activity by colorimetry[J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2000, 5(19) : 251-254

[15]Yue Q K, Kass I J, Sampson N S, et al. Crystal structure determination of cholesterol oxidase from Streptomyces and structural characterization of key active site mutants[J]. Biochemistry, 1999,38(14): 4277–4286.

[16] Li J, Vrielink A, Brick P,et al. Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases[J]. Biochemistry, 1993 32(43), 11507–11515